

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791917

研究課題名（和文）接着性ナノハイドロキシアパタイト - コラーゲン複合体膜の開発

研究課題名（英文）Development of adhesive nano-hydroxyapatite-collagen composite

研究代表者

天雲 太一(Tenkumo Taichi)

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号：80451425

研究成果の概要（和文）：低濃度 BMP-2 に浸漬したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を象牙質片に合わせて移植したところ早期に象牙質上に硬組織を形成できることが確認された。一方、EDC 架橋したナノハイドロキシアパタイト - コラーゲン複合体にフィブリン生体接着剤を添加することで、弾性が付与されることがわかった。また同材料は生体親和性、生体分解性に優れ、BMP-2 の担体として有効であることが *in vivo* で確認された。

研究成果の概要（英文）：Implantation of a nHAC membrane that was loaded with low dose of BMP-2 and placed on dentin chips, into rat thigh muscle, resulted in the formation of a long thin, cementum-like hard tissue on the dentin surface at an early stage after implantation without increasing dentin resorption. On the other hand, the nHAC, cross-linked by EDC and added fibrin glue has more elastic. This new material showed a good biocompatibility and biodegradability *in vivo*. nHAC-fibrin composite with BMP-2 resulted in ectopic bone formation in rat thigh muscle, and showed to be suitable as the carrier of BMP-2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2800000	840000	3640000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周組織・ナノハイドロキシアパタイト・BMP2・弾性

1. 研究開始当初の背景

(1) 欧米では中等度から重度の歯周炎に罹患した場合、すぐに抜歯され、インプラントをする治療が主流になっており、日本にもその傾向が見られ始めている。しかし、インプラント自体は歯周炎に罹患しやすく、より

高度な口腔衛生状態の保持が必要不可欠となる。丁高齢者社会といわれる現在、寝たきりの状態や介護が必要なケースが増え、インプラント周囲の衛生状態を保持することはより困難になってくると考えられる。感染したインプラントの撤去は周囲歯槽骨ごと外

科的に摘出する必要があり、患者の体力的にも負担が大きい。今後、QOLの向上を図る上で、歯の保存に繋がる歯周組織再生治療が必要不可欠なものとなるものと考えられる。

(2) 一方、歯周組織再生研究において最終的な目的は歯根表面を覆うセメント質と呼ばれる硬組織ならびに歯根膜靭帯を再生させることにあり、BMP-2 やエムドゲイン、FBS などの成長因子や人工代用骨、GTR 膜などが開発、研究されてきた。我々も BMP-2 の骨誘導能に注目し、これまでに BMP-2 のセメント質形成能は根面性状や担体、周囲環境に強く影響されることを明らかにしてきた。しかし、人工代用骨を使用した歯周組織再生療法ではセメント質、歯根膜の再生はわずかであり、その適応症及び効果が限られている。この理由として外力に対して歯、歯周囲軟組織、生体材料がそれぞれ別個に動くため再生のための細胞が歯根面へ付着できないことが考えられる。そのため生体材料に硬組織との接着性や弾性を付与できれば、歯と周囲軟組織の動揺差を解消でき、歯周組織再生に有利な環境が与えられるのではないかと考えられる。我々はこれまでにわずかに弾性を持つナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体(以下 n HAC)の膜状生体材料を製作し、生体親和性、生体分解性ならびに BMP-2 の担体として使用した場合、異所性の骨形成が観察されることを報告してきた。しかし、同材料が象牙質表面のセメント質形成や象牙質吸収に及ぼす影響はまだ分かっていない。

2. 研究の目的

(1) BMP-2 を含浸したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜が象牙質表面へのセメント質形成および象牙質吸収に及ぼす影響を組織学的に観察する。

(2) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜に生体接着剤を応用することで弾性もしくは接着性を有した代用人工骨膜を開発する。

3. 研究の方法

(1) BMP-2 を含浸させたナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の象牙質片上に及ぼす組織学的評価

① 材料の作製

アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、中性リン酸 buffer (KH₂PO₄/K₂HPO₄) を加え、さらに CaCl₂

を 9mM になるように加え(Ca:P=5:3)、37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC(1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩)で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した。コントロール群として、コラーゲン膜を精製した。吸引濾過後、同様に 1%EDC(1-エチル・3-カルボジイミド塩酸塩)で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗した後、凍結乾燥した。精製後、X 線回折および SEM による微細構造の観察を行った。

② 組織学的評価

(i) BMP-2 の含浸

①で精製した n HAC 膜を 2×2×0.1mm にトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS) にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000 μg/ml streptomycin 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、PBS で 100, 400 μg/ml に調整した rh BMP-2(R&D)に、10 分間浸漬した。

(ii) 手術方法

動物実験は 10 週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。なお、本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を経て同ガイドラインに従って行った。ラットにペントバルビタール(ソムノペンチル®共立製薬株式会社)の腹腔内投与(7.0×10⁻⁴ml/体重g)による全身麻酔を行い、BMP-2 を含浸させた n HAC 膜を象牙質片と共に大腿筋内に移植した。

(iii) 病理組織学的観察

2、4 週の観察期間後に、移植 n HAC 膜/象牙質片と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン (pH7.4) にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通常に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ 5 μm の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。精製膜と対面する象牙質面長さに対するセメント質形成率と吸収率を画像解析ソフト Scion Image®を用いて測定し、SPSS® 11.0J を用いて統計学的分析を行った。

(2) 接着性ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の開発

① 材料の開発

アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、中性リン酸 buffer (KH₂PO₄/K₂HPO₄) を加え、さらに CaCl₂ を 9mM になるように加え(Ca:P=5:3)、37 度で 12 時間インキュベートした。30 分遠心

分離にかけた後1%EDCで2時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗した。精製したnHAC36mm³に対して80mg/mlフィブリン生体接着剤(ボルヒール®, アステラス製薬, 東京)0-0.3mlをそれぞれ添加後、凍結乾燥した。

精製後、X線回析およびSEM(S-4000 Hitachi, 東京)にて微細構造を観察した。また、吸水率、浸潤状態における50%圧縮強度(EZ-S, Shimadzu, 京都)を測定した。

② 組織学的評価

(i) BMP-2の含浸

80mg/mlフィブリン生体接着剤0.2mlを添加して精製したnHAC-フィブリン複合体を3×3×1mmにトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS)にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000μg/ml streptomycin含有PBSに24時間浸漬した。その後、PBSで0, 100μg/mlに調整したrhBMP-2(R&D)に、10分間浸漬した。

(ii) 手術方法

動物実験は8週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。なお、本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を経て同ガイドラインに従って行った。ラットにペントバルビタール(ソムノペンチル®共立製薬株式会社)の腹腔内投与(7.0×10⁻⁴ml/体重g)による全身麻酔を行い、BMP-2を含浸させたnHAC膜を大腿筋内に移植した。

(iii) 病理組織学的観察

2週の観察期間後に、移植nHAC膜/象牙質片と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン(pH7.4)にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ5μmの連続切片を作製し、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) BMP-2を含浸させたナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の象牙質片上に及ぼす組織学的評価について

① X線回析のパターンがハイドロキシアパタイトと類似し、鈍化したピークが観察されたことから、本研究で合成した精製物はナノハイドロキシアパタイトと判断できた。SEM観察からは、nHAC膜では多孔性を呈し、全面に均一なナノサイズのハイドロキシアパタイト粒子が観察され、コラーゲン線維はほとんど露出していなかった。一方で、コ

ラーゲン膜では非孔性で不定型の表面が観察され、結晶は観察されなかった。

② 組織学的観察からは、全ての群において壊死や感染、材料の露出など重篤な炎症は認められなかった。全てのnHAC膜は小片に分解され、周囲に多核巨細胞が認められた。nHAC-BMP100μg/ml群では2週4週共に象牙質表面にセメント質様硬組織の形成が認められ、周囲に骨芽細胞様細胞が認められた。一方でnHAC-BMP400μg/mlでは2週、4週において不定型の硬組織が象牙質表面に認められた。これに対し、コラーゲン群では2週においてほとんどのコラーゲンが分解され、4週では認められなかった。BMP100μg/ml群では一部に薄い硬組織の形成が認められた。400μg/ml群では象牙質の吸収が広く認められ、吸収窩には多核巨細胞が認められた。これらのことからnHAC膜は生体親和性に優れ、生体分解性があることが確認された。一般にBMP-2はその濃度によって硬組織形成と吸収に影響を及ぼすことが知られている。本研究では、硬組織形成率はnHAC-BMP100μg/ml群とHAC-BMP400μg/ml群間では2,4週共に有意差は認められず、100μg/mlでも早期に高濃度BMP群と同等の硬組織形成率を示した。一方で、nHAC群とコラーゲン群を比較した場合、4週の400μg/ml群を除いて全てのnHAC群で有意差が認められた。

一方で、象牙質吸収に関しては、nHAC群において2週、4週で比較した場合、100μg/ml群では変化がなかったが、400μg/ml群では4週において有意に象牙質吸収が認められた。コラーゲン群においては2週、4週間で有意に象牙質の吸収が認められた。また、4週間群ではBMP400μg/mlコラーゲン、nHAC群はともにBMP100μg/ml群と比較してそれぞれ有意に吸収が認められた。これらの結果は高濃度BMP-2の適用は硬組織形成に加え、硬組織吸収も活発になるというこれまでの報告と一致していた。

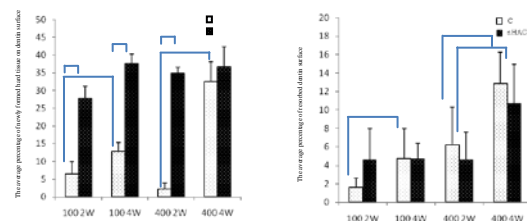


図 硬組織形成率と象牙質吸収率

nHAC膜群がコラーゲン群よりも低濃度BMP-2で有意に硬組織形成率が高かったこ

との原因として BMP-2 のカップリング作用の亢進が考えられた。すなわち、BMP-2 が直接骨芽細胞に分化誘導しただけでなく、複合体膜が分解され、周辺には多核巨細胞が観察されていたことから、BMP-2 が破骨細胞を活性化して nHAC を吸収分解し、Ca の局所濃度が上昇したことで、低濃度 BMP-2 でも象牙質上に有利に硬組織を形成できたのではないかと考えられた。

(2) 接着性ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の開発について

これまでに実験操作中に膜が象牙質片から離れることが多かったことから、膜に接着性を持たせることを検討してきた。これまでに架橋剤の変更(TAD(0.1-1mmol))や生体接着剤(フィブリンゲル)を添加して物性を検討したところ、いずれにおいても乾燥状態では象牙質と付着するものの、湿潤状態では付着させることは困難であった。しかし、その中で EDC 架橋した nHAC にフィブリン生体接着剤を添加した場合、湿潤状態では材料長さを半分になるまで圧縮しても元の長さに戻ることから弾性が付与されることが観察された。外力により歯、歯槽骨、軟組織が別々に動かされる歯周組織においては、材料が弾性の特徴を持つことは、scaffold として有利な機能と考えられる。そこで本研究では nHAC をブロック状に精製し、物性を検討した。

① すべてのフィブリノーゲンを添加した精製物は X 線回析のパターンがハイドロキシアパタイトと類似しており、鈍化したピークが認められた。SEM 観察からは、フィブリンゲル無添加群では微細な多孔性を持ち、50-200 μm の針状の結晶が認められた。これらのことから精製された結晶はナノサイズハイドロキシアパタイトであると判断した。しかし、多孔性構造はフィブリンゲルの添加量が大きくなるに連れて観察されなくなった。

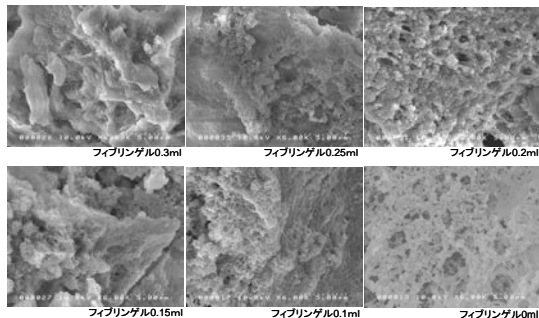


図 2 SEM

一方、ナノハイドロキシアパタイト含有率はフィブリンゲル添加量 0ml, 0.1ml, 0.15ml, 0.2ml, 0.25ml および 0.3ml 群においてそれぞれ 69.53%, 65.22%, 66.54%, 65.94%, 61.4%, 57.5%であった。吸水率は 800-1400%を示し、各群間で有意差は認められなかった。圧縮強度試験では、フィブリンゲル添加量 0ml で 32.6KPa であったのに対し、0.1ml, 0.15ml, 0.2ml, 0.25ml および 0.3ml 群においてそれぞれ 41.02, 42.98, 63.81, 71.62, 78.14KPa を示し、フィブリンゲル添加量が 0.2ml 以上で無添加群と比べて有意に大きいことが確認された。

② 組織学的観察からは、全ての群において壊死や感染、材料の露出など重篤な炎症は認められなかった。BMP2-100 $\mu\text{g/ml}$ 群では nHAC-フィブリン複合体は小片に分解され、その周囲に硬組織の形成が広範囲に確認され、骨芽細胞様細胞や多核巨細胞が観察された。一方、BMP2-0 $\mu\text{g/ml}$ 群では、nHAC-フィブリン複合体は小片に分解され、その周囲に多数の多核巨細胞が観察され、硬組織の形成は認められなかった。このことからナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン-フィブリン複合体は生体親和性、生体分解性を持ち、BMP-2 の担体として有効であることが確認された。

(3) 今後の展望

歯周炎に罹患した場合、ほとんどの場合において不定形の歯槽骨骨欠損となるため、生体材料を使用する場合は粒子状もしくはゲル状形態にすることで適応させてきた。しかし、それでは強度に問題が生じていたが、本研究で開発した nHAC-フィブリン複合体は湿潤状態で適度な弾性を有しているため、不定形の骨欠損形態に適合しやすく、再生のための十分なスペース保持のための強度を保てることや歯根面と密着できると考えられる。今後は、歯周炎モデルにおいて同材料を適用し、組織反応を検討していく予定である。一方、同材料は材質がハイドロキシアパタイトでかつ、比較的多孔性を有していることから *in vitro* においても細胞増殖の足場として使用できる可能性があり、今後検討していく予定である。また、製作するうえで特殊な装置などを必要とせず、安価に製作できることから、将来的に商品化に向けて検討できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Hiroki Tamagawa, Taichi Tenkumo, Tsutomu Sugaya, and Masamitsu Kawanami: Effect of nano-hydroxyapatite on bone morphogenetic protein-2-induced hard tissue formation and dentin resorption on a dentin surface. Applied Surface Science, 査読有, (accepted)

〔学会発表〕（計 1 件）

Taichi Tenkumo, Hiroki Tamagawa, Kaori Ohtani, Atsushi Nakazawa, Tsutomu Sugaya, Masamitsu Kawanami, Fumio Watari: Effects of nano-hydroxyapatite -collagen/fibrin -based composite with BMP-2 application on ectopic bone formation. SIB2011, 14P14. 14.7.2012. Sapporo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天雲 太一 (Tenkumo Taichi)
北海道大学・大学院歯学研究科・
専門研究員
研究者番号：80451425